

**IDENTIFICATION AND DETECTION OF BACTERIUM USING BASE SEQUENCE OF  
RNA POLYMERASE SIGMA-FACTOR GENE**

**Patent number:** JP8256798  
**Publication date:** 1996-10-08  
**Inventor:** YAMAMOTO SATOSHI; HARAYAMA SHIGEAKI  
**Applicant:** KAIYO BIO TECHNOL KENKYUSHO KK  
**Classification:**  
**- international:** C12Q1/68; C12Q1/04; C12N15/09  
**- european:**  
**Application number:** JP19950070096 19950328  
**Priority number(s):** JP19950070096 19950328

**Abstract of JP8256798**

**PURPOSE:** To conduct the subject identification and detection of bacteria useful for diagnosing infectious diseases, development of the microbial environmental cleanup system and food production process control, etc., quickly in high accuracy by using the nucleic acid base sequence of a RNA polymerase &sigma;-factor gene as indicator. **CONSTITUTION:** Using the nucleic acid base sequence of a RNA polymerase &sigma;-factor gene markedly varied even among the same families and strains of a kind of bacteria as indicator, a DNA fragment containing a specific common base sequence among RNA polymerase &sigma;-factor genes of bacteria is amplified by PCR process using a sense primer containing a base sequence coding an amino acid sequence expressed by the formula MYMREMGTV as a part of the amino acid sequence on &sigma;70 of Escherichia coli K12 strain and an anti-sense primer containing a base sequence coding an amino acid sequence expressed by the formula KKEMVEAN; subsequently, the base sequence of the DNA fragment is determined by e.g. dideoxy method, and based on this base sequence, the objective identification and detection of the bacteria is easily and quickly accomplished in high accuracy.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-256798

(43) 公開日 平成8年(1996)10月8日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A
1/04		6807-4B	1/04	
// C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-70096

(22) 出願日 平成7年(1995)3月28日

(71) 出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所  
東京都文京区本郷1丁目28番10号

(72) 発明者 山本 敏

岩手県釜石市平田第3地割75-1 株式会  
社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研究  
所内

(72) 発明者 原山 重明

岩手県釜石市平田第3地割75-1 株式会  
社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研究  
所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の塩基配列を用いた細菌の同定・検出法

(57) 【要約】

【構成】 RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の核酸塩基配列を指標として細菌の同定及び検出を行うことを特徴とする細菌の同定法及び検出法。

【効果】 細菌を高い精度で分類、同定することが可能となる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の核酸塩基配列を指標として細菌の同定を行うことを特徴とする細菌の同定法。

【請求項2】 RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の核酸塩基配列を指標として細菌の検出を行うことを特徴とする細菌の検出法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子( $\sigma 70$ )遺伝子の核酸塩基配列を指標として細菌の同定・検出を行う方法に関する。本発明は医学・各種産業(食品・化学等々)領域および環境保全(水処理・汚染物質の生物分解)において重要な役割を担う細菌を、遺伝子レベルで同定・検出することを可能とする。

## 【0002】

【従来の技術】従来細菌の同定には、糖の資化性等の生化学検査が用いられてきた。しかしこれらを用いた検査はその検査項目が非常に多く煩雑で時間がかかり、にもかかわらず正確な結果を得ることが困難であった。近年では16S rRNAの塩基配列を用いた微生物種の遺伝子レベルでの解析が行われている。しかし16S rRNAは分子進化の速度が遅く、近縁の菌種間ではその差異は微々たるものである。また、近年はDNA-DNAハイブリダイゼーションの結果と食い違うことなどより、種の同定には不適當であるとする研究結果が示されている。このように16S rRNAシーケンスを用いた同定システムでは、細菌の種や株の判定は困難である。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】細菌を高い精度で分類・同定またはモニターするには遺伝子レベルでの比較・検出を行うことが望ましいが、このためには遺伝子のシーケンス情報を、任意の細菌より簡便に入手しうることが必要となる。前述のrRNA遺伝子は種間を通して保存性の高いDNA塩基配列を有し、この配列をいわゆるユニバーサルプライマーとして用いることによって、ほとんどの細菌種で、PCR断片から直接DNA塩基配列を決定することが可能である。しかし、構造遺伝子ではこのような種間を通して保存されたDNA塩基配列は存在しないため、これまでは同様の方法で塩基配列情報を入手することは出来なかった。このため従来はシーケンスを行なうために1種ごとにクローニング操作を行なわなくてはならず、分類・同定といった目的にこれら遺伝子を応用することは事実上不可能だった。

【0004】本発明は、上述したような問題を解決することをその目的とするものであり、具体的には、任意の細菌からRNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子のシーケンス情報を容易に入手する方法を確立し、簡便でかつ精度の高い細菌の同定・検出方法を提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記目的を達成すべく研究を重ねた結果、RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の核酸塩基配列が、同属種間あるいは株間で顕著な相違がみられることを見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は、RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の核酸塩基配列を指標として細菌の同定を行うことを特徴とする細菌の同定法である。

【0006】また、本発明は、RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の核酸塩基配列を指標として細菌の検出を行うことを特徴とする細菌の検出法である。以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、細菌のRNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の塩基配列を指標として当該細菌の同定・検出を行うものである。具体的には、RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子上の特定の塩基配列を含むDNA断片をPCR法により増幅し、ついでジデオキシ法等によりそのDNA断片の塩基配列を決定し、この塩基配列に基づき細菌の同定・検出を行うものである。

【0007】PCR法に用いるプライマーとしては、MYMREMGTVで表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むセンスプライマーとKKEMVEANで表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むアンチセンスプライマーの2種類のプライマーを用いる。図1にこれらのプライマーの塩基配列を示す。それぞれのプライマーの鋳型DNA結合部位は大腸菌K12株の $\sigma 70$ におけるアミノ酸ポジション94から108および376から391に相当する。

【0008】このようなミックスプライマーによる増幅断片は、その塩基配列全体が未知で塩基配列決定用のプライマー配列が得られないため、増幅断片より直接シーケンス反応(ジデオキシ法など)を行うことが出来ない。そこで本発明では図1に示したようにあらかじめプライマー5'末端に既知の配列を付加しておき、この塩基配列をシーケンスプライマーとして用いることによって増幅断片より直接塩基配列を求めることを可能としている。本法によりRNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の、約800塩基対を決定することができる。この方法で決定されるDNA塩基配列はアミノ酸の保存性が比較的低い高変異領域で、進化速度が速く、細菌の同定・検出への利用に適している。

【0009】このようにして得られる塩基配列は、実施例に示すように同属種間あるいは株間で異なっている。また同一種間で比較を行った場合、16S rRNAの塩基配列に較べ顕著に相違度が高い。このため得られたRNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の配列情報を用いることにより、複雑な生化学検査を行うことなしに簡便かつ高精度に菌の同定を行うことが出来る。さらに近縁菌種の塩基配列を同様に求めて多重比較を行うことにより、種あるいは株レベルでの高い特異性を有するプローブやPCRプライマーの作成が可能である。これら特殊配列に基

づくPCRプライマーを使用して増幅された、PCR断片の制限酵素消化パターンを解析することにより、塩基配列の決定を行わなくとも種や株の同定が可能である。

【0010】以上のように、RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子を用いた検出システムは、未知の菌を多数含む天然菌叢中でも目的とする菌を特異的に検出できると期待される。また容易に菌を遺伝子レベルで表現できるため、未同定の新種の記述に用いることが可能である。本発明に用いたプライマーはグラム陰性菌に適用できる。グラム陽性菌については、これらの遺伝子特異的なミックスプライマーによってPCR増幅および塩基配列の決定が可能である。また本発明はRNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子のみならず広く構造遺伝子に適用することも可能である。

【0011】

【実施例】

〔石油分解菌同定への応用〕図1に示したPCRプライマーを用いて、*Pseudomonas putida* 13株と新規海洋性炭化水素分解菌PB4とK23-1株のRNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子のPCR増幅を試みた。この結果、全ての株でほぼ単一の増幅産物を得ることができた。この増幅産物より図1に示したシーケンスプライマーを用いて、ジデオキシ法によりDNA塩基配列を求めた。この

結果を図2に示す。またこれらの塩基配列は、RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子であることがアミノ酸配列の解析結果から確認された。PB4とK23-1株の塩基配列を他の *P. putida* 塩基配列と比較した結果、本株は *P. putida* に属し、既存の株では JCM6156株およびPpG7株に最も近い、新しいタイプであることが確認された。このように *P. putida* 内でもRNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の塩基配列は異なっており、菌株を判別することが可能であった。

【0012】

【発明の効果】本発明により、細菌を高い精度で分類、同定することが可能となる。これは、例えば、感染症の診断などに利用することができ、また、複雑な菌叢から特定の細菌の消長を追うことが可能となり、微生物環境浄化システムの開発、食品製造工程の管理等にも利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子のPCR増幅用のプライマーを示す図である。

【図2】本発明により求められたシュードモナス・プチダのRNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子の部分塩基配列を示す図である。

【図1】

RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子遺伝子のPCR増幅用プライマー

## 【センスプライマー】

T	T	D	P	V	R	M	Y	M	R	E	M	G	T	V
ACT	ACT	GAT	CCT	GTT	CGT	ATG	TAT	ATG	CGT	GAA	ATG	GGT	ACT	GTT
C	C	C	C	C	C		C		C	G		C	C	C
A	A		A	A	A				A			A	A	A
G	G		G	G	G				G			G	G	G
					AGA				AGA					
					G				G					

&gt;PCRプライマー

s70S:

acgactgacccggtacgcatgta(tc)atg(ca)g(atgc)ga(ag)atggg(atgc)ac(atgc)g

t (=44mer)

&gt;シーケンスプライマー

s70sS: acgactgacccggtacgcatgta (=23mer)

## 【アンチセンスプライマー】

K	K	E	M	V	E	A	N	L	R	L	V	I	S	I
AAA	AAA	GAA	ATG	GTT	GAA	GCT	AAT	TTA	CGT	TTA	GTT	ATT	TCT	ATT
G	G	G		C	G	C	C	G	C	G	C	C	C	C
				A		A		CTT	A	CTT	A	A	A	A
				G		G		C	G	C	G		G	
								A	A	A			AGT	
								G	G	G			C	

&gt;PCRプライマー

s70R:

atagaaataaccagacgtaagtt(atgc)gc(tc)tc(agtc)accat(ct)tc(ct)tt(ct)tt

(=44mer)

&gt;シーケンスプライマー

s70sR: atagaaataaccagacgtaagtt (=23mer)

注：下線部はアミノ酸保存性配列およびそれに対応するプライマー配列を示す。また括弧内の塩基はそのポジションが、これら塩基のミックスであることを示す。

【図2】

シュドモナス・ブチダのRNAポリメラーゼの因子遺伝子の部分塩基配列

IFO14164	1:GTCGAGCTTCGACCCCGAAGGCGAGATCGAAATCGCCAGGCTATCGAGGAGGSCATC	50
ATCC11172	1:.....	50
ATCC17485	1:.....	50
ATCC23975	1:.....	50
FK715	1:.....G.....	50
JCM6156	1:.....G.....T	60
PpG7	1:.....G.....T	60
PB4	1:.....G.....T	60
K23-1	1:.....G.....T	60
A10	1:.....G.....	60
BH	1:.....G.....	60
IFO14671	1:.....G.....T.....T.....	60
IFO3738	1:.....A.....A.....T.....	60
ATCC17484	1:.....C..C..G..T.....A..T.....T..A..G..T.....	60
ATCC17522	1:.....C..C..T..T.....A.....T..A..G.....	60
PSEKPODA	1:..G..A..G.....C.....	60
ECORPSPPO	1:..T..A..CT.....A..T..C.....T..A..C..G.....	60
STYUGDOP	1:..T..A..CT.....G.....A.....C.....T..A.....A..C..G.....	60
BUCHCYSE	1:..T..AT..A..A..A..G..T..A..T..T..A..T..A..C..T..A.....T	60
IFO14164	61:CGTGAAGTCATGGGGCCATGCTCACTTCCCGGCACCTGCGATTACATTCGCGGAA	120
ATCC11172	61:.....	120
ATCC17485	61:.....	120
ATCC23975	61:.....	120
FK715	61:.....G.....C.....T.....A.....	120
JCM6156	61:.....C.....C.....	120
PpG7	61:.....C.....C.....	120
PB4	61:..C.....T.....C.....C.....	120
K23-1	61:..C.....T.....C.....	120
A10	61:.....C.....C.....	120
BH	61:.....C.....C.....	120
IFO14671	61:.....C.....T.....C.....	120
IFO3738	61:.....G.....T..G.....C.....C.....C.....	120
ATCC17484	61:.....G..A..A.....G.....T.....G..T..C..T.....TC.....	120
ATCC17522	61:.....G..A..A.....G.....T.....G..T..C..T.....TC.....	120
PSEKPODA	61:..C.....G..A.....C..G.....G..G..CAG...C..C..C..C	120
ECORPSPPO	61:AACC..G..TCAAT..T..G..T..G..A..AT...AAG..GA..ACC..TC..G..G..AAC..G	120
STYUGDOP	61:AACC..G..TCAAT..T..G..T..CG..A..A...AAG..CA..TACC..TC..G..G..AAC..G	120
BUCHCYSE	61:AA..C.....TCAATCTT..G..AT..AG..A..AT..A..AAG..A..TAC...TC..T..A..AAC...T	120
IFO14164	121:TATGACCGGCTCACCACGAGGCGGAGACTGTGGGACGTCTCAGCGGTACATCGAC	180
ATCC11172	121:.....C..C.....	180
ATCC17485	121:.....C..C.....	180
ATCC23975	121:.....C..C.....	180
FK715	121:.....T..C..C.....C.....C.....	180
JCM6156	121:.....T..C..C.....T.....	180
PpG7	121:.....T..C..C.....T.....	180
PB4	121:.....T..C..C.....T.....	180
K23-1	121:.....T..C..C.....T.....	180
A10	121:.....T.....A..T..C..T.....C.....T.....	180
BH	121:.....G..A..T..C..T.....T.....	180
IFO14671	121:.....G.....A..T..C..T.....C.....T.....	180
IFO3738	121:..C.....A..T..C..T.....C.....T..C.....	180
ATCC17484	121:..CACT.....T.....A..T..C..C.....C.....G.....T.....	180
ATCC17522	121:..CACT.....T.....A..T..C..C.....C.....C.....T.....	180
PSEKPODA	121:..CA..T..A..GT..G..A.....T..C..C..C.....C.....T.....T	180
ECORPSPPO	121:..CA..T..T..TGAAG..A..AA..CG..T.....C..TC..A..C..C..TTG..T.....	180
STYUGDOP	121:..C..T.....TGAGG..T..A..AG..CT..TT.....C..TC..TA..C..C..TTG..T	180
BUCHCYSE	121:.....T..AA..T..AA..T..GTCAAT.....T..A..T..TA..AA..A..CA..A..TTG..G..T	180

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**